Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. E. Bock

Versuche zur Trennung von Insulin-Antiinsulin-Komplexen durch Humanglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Harms
aus Hamburg

1969

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. E. Bock

Versuche zur Trennung von Insulin-Antiinsulin-Komplexen durch Humanglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Harms
aus Hamburg

1969

RIJKSUNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern

gewidmet

INHALT

Seite

I. Einleitung 2
II. Methoden 4

A) Vorversuche zur Fällung von Insulin aus normalem Human- und aus Diabetikerserum mit Humanglobin.

a) Bestimmung des pH-Optimums 5
b) Globinkonzentration 5
c) Insulinkonzentration 6
d) Abhängigkeit von der Zeit 7
e) Globin im Überstand 7
f) Insulinfällung aus dem Serum 8
g) Bestimmung der Insulinbindungskapazität 9
h) Herstellung der Antihumangammaglobuline (-Kaninchengammaglobuline) 1o

B) Hauptversuch zur Insulinfällung

a) Insulin-Bindungskapazität der Überstände nach der Globinfällung 12
b) HEIDELBERGER-Präzipitinkurve vom Überstand 14
c) Doppelantikörperfällung im Überstand bei unterschiedlicher Insulinkonzentration 14

III. Ergebnisse und Diskussion 16
Abbildungen 21
IV. Zusammenfassung 28
V. Literaturverzeichnis 29

I. Einleitung

Bei Diabetikern war bisher eine Bestimmung des Seruminsulins nur dann möglich, wenn die Patienten noch nicht mit Insulin behandelt waren. Denn so ziemlich jeder Mensch reagiert auf die Injektion von artfremdem Insulin mit der Bildung humoraler Insulinantikörper (TUFT, 1928; BANTING, FRANKS u.GAIRNS, 1938; LOWELL, 1942; PFEIFFER u. DITSCHUNEIT, 1962). Da der Insulinspiegel gegenwärtig nur auf dem Umweg über die Adsorption von Insulin an insulinbindende Antikörper gemessen werden kann, verfälschen bereits vorhandene Insulinantikörper die Meßergebnisse. Diese Schwierigkeit konnte bislang nur durch umständliche Extraktion der Diabetikerseren in Einzelfällen umgangen werden (SKOM u. TALMAGE, 1958). Da aber der Insulingehalt von Diabetikerseren auch dann von Interesse ist, wenn die Patienten mit Insulin substituiert sind, wurde nach einem einfachen und schonenden Verfahren zur Abtrennung von Insulin aus der Bindung an humorale Antikörper gesucht. Versuche mit Akridinabkömmlingen, beispielsweise Rivanol^{R} und Surfen^{R}, hatten zu keinem sicheren Ergebnis geführt (BECK, H., 1966). Ähnlich wie Surfen^{R} bildet auch Globin, der Proteinanteil des Hämoglobins, Komplexe mit Insulin und dient bei der Insulinsubstitution von Diabetikern als Verzögerungssubstanz. Antigen-Antikörperkomplexe dissoziieren in saurer Lösung (Übersicht bei KABAT und MAYER, 1961). Insulin, Gammaglobuline und Globin sind bei p_H-Werten unter 4,o ebenso wie oberhalb p_H 7 (BERSON, 1959) gut löslich, dagegen ist Globin in der Nähe des

Neutralpunktes schwerlöslich. Daher wurde nun versucht, die Bindung zwischen Insulin und Insulin-Antikörper durch Ansäuerung von Diabetikerseren zu sprengen, durch Zufügen von Globin einen Insulin-Globinkomplex herzustellen und den Komplex durch Neutralisieren auszufällen.

II. Methoden (Vorversuch)

In orientierenden Versuchen mit ^{131}J-Rinderinsulin-haltigem Humanserum ließ sich die fällbare Radioaktivität mit Humanglobin "reinst"[x] (=HGL) nach Zugabe von Glycinpuffer p_H 8,45 präzipitieren. Bei dem Präzipitat mußte es sich also um einen Insulin-HGL-Komplex handeln. Im folgenden wurden die Bedingungen für die optimale Fällung von ^{131}J-Rinderinsulin aus Humanserum ermittelt. Für die Vorversuche wurde eine 2 g%-ige HGL-Lösung in aqua dest. angesetzt, die mit 1n-HCl auf p_H 3,4 eingestellt wurde. Oberhalb dieses p_H-Wertes fiel das Globin wieder aus. Das verwendete Humanserum wurde auf p_H 4 eingestellt, damit nicht schon vor Zugabe des Glycinpuffers (p_H 8,45) aus dem Serum-HGL-Ansatz das Insulin präzipitiert wurde. Das ^{131}J-Rinderinsulin der Farbwerke Hoechst hatte je nach Charge eine spezifische Aktivität von 1o...12 mCi ^{131}J/mg Insulin, und die Lösungen enthielten o,o22... o,o37 mg Insulin/ml. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillations-Bohrlochkristall (FH 781) mit einem Einkanal-Impulshöhenanalysator (FH 62, FRIESEKE und HOEPFNER, Erlangen), der an ein Strahlungsmeßgerät (FH 498) angeschlossen war. Bei einer Hochspannung von o,75 KV lagen die Optima für ^{131}Jod bei

Verstärkung: 16 V
Kanalbreite: 1o V
Kanallänge : 42 V

Die p_H-Messung erfolgte mittels kombinierter Glaselektrode (GK 2o21 B) an einem p_H-Meter (Radiometer, Copenhagen, PHM 22p), nach der Eichung mit Pufferlösung von p_H 7.

---

x) Die Farbwerke Hoechst überließen mir dankenswerterweise größere Mengen Humanglobin, Charge DR. 129.

a) Bestimmung des pH-Optimums bei der Fällung des Insulins durch HGL

2 ml Humanserum wurden mit 1oo µl ^{131}J-Rinderinsulin versetzt. Zu je 15o µl 2 g%-igem HGL wurden 1o µl des Serumansatzes und in aufsteigenden Reihen 1o...1ooo µl Glycinpuffer (P_H 8,45) gegeben. Das Präzipitat wurde zweimal mit je 1 ml Phosphatpuffer (p_H 7) gewaschen, jeweils 1o Minuten bei 4ooo $\bar{g}$ zentrifugiert und das Sediment 1 Minute gezählt. Als Standard galt eine Mischung von 2 ml NaCl o,9% + 1oo µl ^{131}J-Insulin-Stammlösung. Es ergab sich dabei:

µl Glycinpuffer	1o	2o	4o	5o	6o	7o	75	8o	85	1oo	2oo	4oo	8oo	1ooo
Fällung in %	3	4	23	34	82	84	82	79	79	67	59	51	42	27

Von dem Ansatz mit 7o µl Glycinpuffer wurde die zehnfache Menge hergestellt und ein p_H-Wert von 6,96 gemessen.

b) Änderung der Humanglobinmenge

Es wurde untersucht, wieviel HGL für eine möglichst vollständige Fällung des Insulins aus 1o µl radioaktivem Serum nötig ist. Der Glycinpuffer wurde entsprechend der abnehmenden Menge des HGL mit aqua dest. verdünnt. Jeweils 1o µl des mit ^{131}Jod-Rinderinsulin versetzten Serums (≙ 15 ng Insulin) wurden vorgelegt und das Insulin gefällt mit:

µl 2 g% HGL	7o µl Glycinpuffer (p_H 8,45)	Fällung in %
15o (=3 mg HGL)	1:1 verdünnt	92
12o (=2,2 mg)	4:5	87,5
1oo (=2 mg)	2:3	92,2
8o (=1,6 mg)	8:15	93,1
6o (=1,2 mg)	2:5	9o,2
4o (=o,8 mg)	4:15	5o,7
2o (=o,4 mg)	2:15	8,1
1o (=o,2 mg)	1:15	7,9
5 (=o,1 mg)	1:3o	7,1

c) Abhängigkeit der Fällbarkeit von Insulin mit HGL von der Insulin-Konzentration

Es wurde eine Insulinverdünnungsreihe von 28...o,44 ng Insulin angesetzt. 2 ml Humanserum wurden mit 25o µl ^{131}J-Rinderinsulin (Konz. o,o22 mg Ins./ml) versetzt und mit nichtradioaktiven Normalseren verdünnt. Als Standard galt eine Mischung von 2 ml NaCl o,9% + 25o µl ^{131}J-Rinderinsulin.

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe:

Verdünnung 1	:1	:2	:3	:6	:8	:12	:16	:24	:48	:64
Fällung in %	84	8o	84	84	86	88	83	87	82	83

d) Insulinfällung durch Humanglobin in Abhängigkeit von der Zeit

Es wurde untersucht, ob das Ergebnis der Fällung von Insulin durch Humanglobin zeitabhängig ist.

Dazu wurden

2 ml eines normalen Humanserums (A)

eines Diabetikerserums Ja. (B)

einer 7 %-igen Humangammaglobulinlösung (Hoechst) (C)

einer 7 %-igen Humanserumalbuminlösung (Behringwerke) (D)

mit je 5o µl ^{131}J-Rinderinsulin versetzt (≙ 22 µg Insulin/ml Proteinlösung) und auf p_H 4 eingestellt. Als Standard diente eine Mischung von 2 ml NaCl o,9 %-ig + 5o µl ^{131}J-Rinderinsulin.

Pro Ansatz wurden 5 Reagenzgläser folgendermaßen beschickt:

1oo µl 2 g% HGL + 1o µl ^{131}J-Rinderinsulinlösung (A)...(D) + 7o µl Glycinpuffer. Das Präzipitat wurde zweimal mit je 1 ml Phosphatpuffer p_H 7 gewaschen. Es ergaben sich folgende Fällungen in %:

nach	(A)	(B)	(C)	(D)
o min	76	65	73	75
1o min	82	66,2	79	78
3o min	83,4	76	78,7	8o
2 Std.	82	75	78	78
12 Std.	83,5	75,5	78	79

e) Prüfung auf fällbares Humanglobin im Überstand nach der Fällung

Es wurden für diese Untersuchung die 3o min - Überstände vom vorangegangenen Zeitabhängigkeitsversuch verwendet. Zu den Überständen wurden 1o µl der radioaktiven Ausgangsseren oder -lösungen hinzugefügt.

Dabei trat keine neue Präzipitatbildung auf. Nach dem Dekantieren und zweimaligen Waschen mit je 1 ml Phosphatpuffer p_H 7 verblieben im Reagenzglas von der ursprünglichen Impulszahl beim

Diab.Ser. Ja.	5,65 %
normalen Hum.Ser.	5,4o %
7 % HSA	5,5o %
7 % Hum.-γ-Globul.	4,4o %

Ein gleichzeitig gemessener Leerwert mit der gleichen Ausgangsradioaktivität von etwa 2o ooo Impulsen/min ergab 5,4o %. Zur Überprüfung, ob sich auch zwischen dem in Lösung verbliebenen HGL und zugefügten ^{131}J-Insulin Komplexe bilden, wurden die Überstände der oben angegebenen Seren und verschiedenen Proteinlösungen nach 5o %-iger und nach 8 %-iger Fällung mit HGL in der Agargel-Zonenelektrophorese aufgetrennt und von den getrockneten Gelen Autoradiogramme angefertigt. Damit ließ sich ein löslicher Insulin-HGL-Komplex deutlich sichtbar machen.

f) Fällung des Insulins aus normalem Humanserum und aus Diabetikerseren

Unter Beachtung der Ergebnisse der bisherigen Vorversuche sollte jetzt aus normalem Humanserum und aus Diabetikerseren verschiedener Bindungskapazität an Insulin (= BK) radioaktives Insulin gefällt werden. 2 ml Serum wurden 5o µl ^{131}J-Rinderinsulin hinzugefügt, auf p_H 4 mit 1 n-HCl eingestellt. 1o µl davon wurden nach der HGL-Zugabe mit Glycinpuffer p_H 8,45 gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit je 1 ml Phosphatpuffer p_H 7 gewaschen. Als Standard galt eine Mischung von 2 ml o,9 % NaCl + 5o µl ^{131}J-Rinderinsulin.

Der Ansatz:
loo µl 2 g% HGL + lo µl Normal- oder Diabetikerserum mit ^{131}J-Rinderinsulin + 5o...9o µl Glycinpuffer.

Messergebnisse (% der Gesamtradioaktivität fällbar)

Glycin-puffer (p_H 8,45)	Serumart			
	Normal BK o,o µg/ml	Diab.Ja. BK 3,47 µg/ml	Diab.Nä. BK 1,84 µg/ml	Diab.Mo. BK 2,1µg/ml
5o µl	56 %	66 %	57,5 %	62 %
6o µl	7o %	82 %	74 %	74 %
7o µl	87 %	87,2 %	83,5 %	87 %
8o µl	8o %	83 %	81,5 %	8o %
9o µl	64 %	73 %	77,5 %	7o %

BK = Insulinbindungskapazität (Agargelelektrophorese)

g) Bestimmung der Insulinbindungskapazität (= BK)

Die Insulinbindungskapazität der Seren wurde mittels Agargel-Zonenelektrophorese in Verbindung mit einem Dünnschichtscanner bestimmt (KALLEE, E., 1967). Der Gelansatz wurde hergestellt aus 1,5 g Spezialagar-Noble, (Difco Laboratories Detroit, Mich.) 2o ml Veronalpuffer (LKB 32 76 - VB Stockholm) und 8o ml aqua dest. Die Lösung wurde gekocht, bis sie klar blieb und danach gleichmäßig auf die Objektträger verteilt. Der Ansatz wurde am Tag zuvor 2 Std. bei 37°C inkubiert und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 25o µl Patientenserum, lo µl ^{131}J-Rinderinsulin (Hoechst) und 25 µl Trägerinsulinlösung (Rinderinsulin loo µg/ml). Etwa 2o µl davon

wurden auf die Mitte eines Objektträgers, der mit Agargel beschichtet war, in ein ausgestanztes Loch pipettiert und 1 Tropfen o,2 %-Bromphenolblaulösung dazugegeben. Der Farbstoff dient bei der Elektrophorese zur Markierung der Wanderungsgeschwindigkeit des Humanalbumins, an das es gebunden wird (ROTH u. KALLEE, 1953). Als Elektrolyt diente Veronalpuffer. Der Strom wurde für 2 1/2 Std. mit dem LKB Power Supply, Type 32 9o B, auf 13o V, 5o mA für 18 Objektträger eingestellt. Nach dem Trocknen über Nacht wurden die Objektträger mit einem Dünnschichtscanner LB 27 21 (Berthold, Wildbad) durch eine Blende von 2 x 2o mm bei einem Vorschub von 6oo mm/h gezählt. Anschließend wurden die Objektträger auf Röntgenfilm für 16 Std. in Kassetten eingelegt und entwickelt. Der Anteil der Insulin-AK wurde durch Übertragung des auf dem Autoradiogramm sichtbaren Gammaglobulinanteils auf die vom Dünnschichtscanner auf Papier digital-registrierten Impulse errechnet. Bei der Bestimmung der Insulin-Bindungskapazität der Überstände des Hauptversuches wurde vom Überstand direkt ausgegangen, also kein zusätzliches ^{131}J-Rinderinsulin und Trägerinsulin hinzugegeben.

h) Isolierung der Gammaglobuline aus einem Kaninchenmischserum mit hohem Insulin-AK-Gehalt

Aus 28 ml Kaninchenserum[x], das AK gegen Humangammaglobulin enthielt, wurden die Antikörper (= Antihumangammaglobulin [=Kaninchen-Gammaglobulin]) durch fraktionierte, absteigende Ammoniumsulfat- (= AS)-Fällung von 5o...33 %-iger Sättigung nach dem von KALLEE et al. (1963) angegebenen Verfahren gewonnen. Nach der Dialyse der Niederschläge wurden die Antikörper in Abweichung vom ange-

x) Herr Dr. Michael SCHOLZ überließ mir dankenswerterweise größere Mengen AK-haltiger Seren.

gebenen Verfahren ohne Rivanolreinigung lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 385 mg Protein. Es wurde davon eine 10 %-ige Lösung hergestellt, die mit 1 %-iger Human-Serum-Albumin-(= HSA)-Lösung abgesättigt (absorbiert) und mit NH_3 auf p_H 7,8 eingestellt wurde.

B) Hauptversuch

8 Diabetikerseren verschiedenen Ins.-AK-Gehaltes und zum Vergleich ein normales Humanserum wurden unter den in den Vorversuchen gefundenen optimalen Bedingungen mit ^{131}J-Rinderinsulin versetzt und das Insulin mit HGL gefällt. Das Präzipitat wurde verworfen und der Überstand untersucht. Es interessierte hier, ob durch die Fällung des Insulins mit HGL die Insulin-AK vom Insulin getrennt wurden und in den Überstand gingen.

a) Insulin-Bindungskapazitätsbestimmung der Überstände nach der HGL-Fällung

Als Ansätze dienten jeweils 1 ml-Portionen folgender Seren:

1.	Norm.Hum.Serum	Ha. mit o,oo µg	Ins.-Bindungskapazität pro ml
2.	Diab.Ser.	Na. mit 1,12 µg	"
3.	"	Di. mit o,88 µg	"
4.	"	Wa. mit o,7o µg	"
5.	"	Mi. mit o,195 µg	"
6.	"	Mo. mit 2,1o µg	"
7.	"	Sto.mit o,95 µg	"
8.	"	Je. mit 1,77 µg	"
9.	"	Ja. mit 1,o5 µg	"

Die Seren wurden auf p_H 4 eingestellt und jeweils 25 µl ^{131}J-Rinderinsulin dazupipettiert (≙ o,55 µg Insulin/ml Serum). Davon entnommen wurden loo µl je Serum-Ansatz und weiter nach folgendem Schema verfahren.

Versuchsreihe (A)	Versuchsreihe (B)
1oo µl ^{131}J-Serum	1oo µl ^{131}J-Serum
+ 5oo µl 4 g% HGL (p_H 3,4)	+ 5oo µl Glycinpuffer (p_H 3,4)
+ 7oo µl Glycinpuffer (p_H 8,45)	+ 7oo µl Glycinpuffer (p_H 8,45)
+ 2oo µl 1o g% HSA	+ 2oo µl 1o g% HSA

Die Globinfällung gab einen deutlichen, weißen Niederschlag, wohingegen die parallel laufende Versuchsreihe (B) ohne Globinzusatz klar blieb. Die Ansätze wurden 1o min bei 4ooo $\bar{g}$ zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment verworfen. Anschließend wurden in den Überständen von (A) und (B) die Insulinbindungskapazität bestimmt, jedoch wurde wegen der geringen Impulszahl in Abänderung der vorher beschriebenen Methode eine 4 mm-Blende vor dem Zählrohr gewählt und der Papiervorschub synchron mit der Durchlaufgeschwindigkeit der Objektträger auf 12o mm/h herabgesetzt. Die Präparate der Agargel-Zonenelektrophorese wurden 16 Tage auf einen Röntgenfilm in eine Kassette eingelegt und nach dem Entwickeln ausgewertet.

Insulin-Bindungskapazität µg/ml

Serum	Überstand (A)	Überstand (B)
Ha (o,oo)	o,oo	o,oo
Nä (1,12)	6,14	5,93
Di (o,88)	2,8o	2,2o
Wa (o,7o)	1,9o	o,96
Mi (o,195)	2,61	1,29
Mo (2,1o)	5,o9	4,81
Sto(o,95)	3,43	2,5o
Je (1,72)	5,86	5,14
Ja (1,o5)	4,99	4,64

b) HEIDELBERGER-Kurve

Eine quantitative Fällungskurve von den Überständen (A) und (B) nach HEIDELBERGER wurde hergestellt zur Bestimmung des optimalen Antigen:AK-Verhältnisses. Es wurden je 2o...2oo µl Überstand der Humanseren vorgelegt und mit 1o µl Kaninchen-Gamma-Globulin gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit o,2 g%-iger HSA-Lösung gewaschen. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 1.

c) Einfluß unterschiedlicher Insulinkonzentration auf die Doppel-AK-Fällung

Zu ca. 5oo µl Überstand (A) nach der Globinfällung des Diabetikerserums Ja. wurden 1o µl 1:4o mit o,2 g% HSA verdünnte ^{131}J-Insulin-Stammlösung hinzugegeben, so daß Überstand (A) und (B) etwa gleich viel ^{131}J-Insulin enthielten. Anschließend wurden die verdünnten Serumansätze (vor und nach HGL-Fällung) nochmals mit jeweils 1oo µl 1:4o verdünnter ^{131}J-Rinderinsulin-Stammlösung versetzt. Das entspricht einer Endkonzentration von ca. o,o4 µg Insulin/ml Serum. Von beiden Ansätzen wurden je 1oo µl (≙ 18,5 ng Insulin) vorgelegt und 1o...5o µl 1:4 mit o,2 g% HSA verdünnte ^{131}J-Rinderinsulin-Stammlösung dazupipettiert ohne Trägerinsulin-Zusatz. Mit je 1o µl Kaninchen-Gammaglobulinlösung wurde gefällt, das Präzipitat mit o,5 ml o,2 g% HSA zweimal gewaschen und die Impulse gezählt.
Es ergab sich für:

1:4 verd. ^{131}J-Insulin in µl	Ins.Konz.im Überstand	% der Gesamtradioaktivität fällbar	
		Überstand (A) nach HGL-Fäll.	Überstand (B) ohne HGL-Fäll.
1o (= 92 ng)	11o,5 ng	38,2	34,5
2o (=184 ng)	2o2,5 ng	37,6	35,6
3o (=276 ng)	294,5 ng	36,8	37,2
4o (=368 ng)	386,5 ng	37,2	33,4
5o (=46o ng)	478,5 ng	36,9	34,1

III. Ergebnisse und Diskussion

In den hier durchgeführten Versuchen ließ sich ^{131}J-Insulin mit Humanglobin (= HGL) zu über 80 % aus normalem Human- oder Diabetikerserum fällen. Als Optimum für die Fällung erwies sich ein Verhältnis von 150 µl 2 g%-HGL, 10 µl ^{131}J-Insulin-Serum-Gemisch und 70 µl Glycinpuffer (p_H 8,45). Unter diesen Bedingungen betrug der End-p_H-Wert 6,96 (Abbildung 1). Dementsprechend wurde für die Waschung der Globinsedimente ein Phosphatpuffer p_H 6,96 verwendet. Mindestens 1,6 mg HGL (80 µl einer 2 g%-HGL-Lösung) müssen zugefügt werden, um 15 ng ^{131}J-Insulin aus 10 µl Serum zu fällen. Mehr HGL bringt für die Ausbeute keinen Vorteil, aber auch keinen Nachteil (Abbildung 2). Die Insulinkonzentration im Serum beeinflußte die prozentuale Fällung des Insulins nicht. In einer Insulinverdünnungsreihe von 28...0,44 ng Insulin pro 10 µl Serum fiel das Insulin durch HGL gleichmäßig aus (Abbildung 3). Das Maximum der Fällbarkeit des Insulins durch HGL war nach 30 min Reaktionszeit bei Zimmertemperatur erreicht. Danach blieb der Anteil des Präzipitates konstant (Abbildung 4). Es wurde überprüft, ob nach der Fällung das im Überstand verbliebene HGL nach Zugabe von 10 µl der radioaktiven Ausgangsseren oder Proteinlösungen mit ^{131}J-Insulin erneut Komplexe bildet. Im Vergleich zu einem gleichzeitig gemessenen Leerwert ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, die auf die Anwesenheit eines Insulin-HGL-Komplexes hinwiesen. Die Auftrennung der Überstände der verschiedenen Proteinlösungen in der Agargel-Zonenelektrophorese ergab

jedoch einen deutlich sichtbaren Insulin-HGL-Komplex auf den Autoradiogrammen der getrockneten Gele. Im einzelnen ließen sich folgende Befunde erheben:
1. HGL ist bei p_H 7 zu o,2 % im Humanserum löslich. Bei dieser HGL-Konzentration bindet das HGL im Normalserum und in anderen Proteinlösungen 2o-3o % der zugefügten Insulinradioaktivität. Da das HGL in rein wässriger Lösung bei der gleichen Konzentration ausfällt, wirken hinreichend hochkonzentrierte Serumproteine offenbar als Schutzkolloide für das HGL.
2. Bei höheren HGL-Konzentrationen fällt ^{131}J-Insulin zusammen mit HGL aus. Aus AK-haltigen Seren wird wahrscheinlich in erster Linie das nicht AK-gebundene Insulin präzipitiert. Bei niedriger HGL-Konzentration in Diabetikerseren läßt sich die Bindung von ^{131}J-Insulin an HGL nicht so deutlich sichtbar machen wie bei Verwendung von Normalserum.
Die Untersuchung über die Fällung des Insulins aus einem normalen Humanserum und 3 Diabetikerseren verschiedener Insulin-Bindungskapazität (=BK) ergab keine Abhängigkeit der fällbaren Radioaktivität vom AK-Gehalt der Seren (Abbildung 5). Demnach ist es offenbar möglich, Insulin mit Hilfe von HGL zu fällen, obwohl es an AK gebunden ist. Die Fällung des Insulin-HGL-Komplexes konnte nur auf zweierlei Weise zustande kommen: Entweder wurde das radioaktive Insulin zusammen mit dem daran haftenden AK durch das Globin ausgeflockt, oder die Bindung von Insulin an Globin war soviel stärker, daß das Insulin durch das Globin aus der AK-Bindung desorbiert wurde. Wäre der Insulin-AK zusammen mit dem anhaftenden Insulin ausgefällt worden, dann hätte der Überstand der Globinfällung einen erheblich verminderten AK-Titer aufweisen müssen. Daher wurde der AK-Titer von Diabetikerseren vor und nach der Globinfällung geprüft.

Für diese Untersuchung wurde das ^{131}J-Insulin aus 8 Diabetikerseren unterschiedlicher Bindungskapazität und zum Vergleich aus normalem Humanserum mit HGL gefällt. Die HGL-Konzentration der Globinstammlösung wurde in Abänderung von den Vorversuchen auf 4 g% erhöht, um die Verdünnung des Serums möglichst niedrig zu halten. Parallel zu diesem Versuch wurde der gleiche Ansatz für alle Seren ohne HGL vorbereitet und statt dessen eine der HGL-Lösung entsprechende Menge Glycinpuffer (p_H 3,4) zugefügt. In diesem parallelen Versuch trat deshalb keine Insulinfällung auf. Im folgenden wurden die dekantierten Überstände beider Versuchsreihen gleich behandelt. Die elektrophoretische Bestimmung der Überstände der Diabetikerseren nach und ohne HGL-Fällung ergab unterschiedliche Werte (Tabelle S. 13). Vermutlich desorbiert HGL nicht nur das in vitro zugefügte, sondern auch das im Diabetikerserum bereits vorhandene und an AK gebundene Insulin. Infolgedessen können durch die HGL-Fällung wahrscheinlich Bindungsplätze an den Insulin-AK frei werden, wodurch der AK-Titer fast aller mit HGL gefällten Diabetikerseren in diesen Experimenten anzusteigen schien.

Zur weiteren Klärung dieses Problems wurde die quantitative Präzipitinreaktion nach HEIDELBERGER mit den 8 Diabetikerseren und dem normalen Humanserum durchgeführt. Dabei wurden steigende Mengen (2o ... 2oo µl) HGL-Überstand oder entsprechende Serumverdünnungen vorgelegt und mit jeweils 1o µl Antihumangammaglobulin (Kaninchen-Gamma-Globulin) der Insulin-AK des Überstandes ausgefällt. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 1. Der Äquivalenzpunkt der Fällungskurven war unterschiedlich nach 4o µl (in 5 Fällen), 6o µl (neunmal) oder 8o µl (zweimal) Antigenlösung erreicht. Aus diesen Ergebnissen läßt sich keine eindeutige Änderung der Insulinbindungskapazität der AK durch die

HGL-Fällung erkennen. Immerhin war auch mit dieser Versuchsanordnung kein meßbarer AK-Verlust festzustellen.

Die beiden hier eingesetzten, völlig verschiedenen Methoden zur Prüfung der Bindungskapazität von Insulin-AK haben in der Größenordnung gleichsinnige Resultate erbracht. Dies berechtigt zu folgender Überlegung: Durch die Ansäuerung der Diabetikerseren auf p_H 4 wird der Insulin-Anti-Insulin-Komplex dissoziiert. Nach Zufügen des ebenfalls sauren Globins (p_H 3,4) bildet sich im sauren Milieu ein Insulin-Globin-Komplex, der beim Neutralisieren ausfällt. Die Bindungskapazität der Insulin-AK nimmt bei dieser Prozedur augenscheinlich keinen Schaden, denn der AK-Titer bleibt auch nach der Globinfällung nahezu unverändert. Mittels der Globinfällung können also insulinbindende AK vom gebundenen Insulin auf einfache Weise befreit werden, ohne daß anschließend eine sofortige Wiedervereinigung von Insulin und Anti-Insulin stattfindet.

Zu Tabelle 1: Präzipitinreaktion nach HEIDELBERGER zur Bestimmung des optimalen Antigen : AK-Verhältnisses.

Steigende Mengen (2o...2oo µl) HGL-Überstand oder entsprechende Serumverdünnungen wurden vorgelegt und mit jeweils 1o µl Antihumangammaglobulin (Kaninchengammaglobulin) der Insulin-AK des Überstandes ausgefällt.
Der Äquivalenzpunkt der Fällungskurve wurde unterschiedlich nach 4o µl (in 5 Fällen), 6o µl (neunmal) oder 8o µl (zweimal) Antigenlösung erreicht. Eine eindeutige Änderung der Insulinbindungskapazität der AK durch die HGL-Fällung läßt sich nicht erkennen. Ein meßbarer AK-Verlust war in dieser Versuchsanordnung nicht feststellbar.

Tabelle 1: Ergebnisse zur Präzipitinreaktion nach HEIDELBERGER

Fällung der Überstände in % der ^{131}J-Insulin-Gesamtradioaktivität

Seren:

	Menge Überstand in µl	Ha (norm.)	Nä	Di	Wa	Mi	Mo	Sto	Je	Ja
nach Globinfällung (A)	2o	6,7	55,6	32,6	35,5	18,3	78,3	27,o	63,2	44,3
	4o	8,o	64,3	34,2	37,4	19,7	82,7	3o,3	67,o	45,3
	6o	8,3	63,2	38,o	31,1	24,2	82,1	35,1	73,1	53,o
	8o	7,2	62,1	36,7	27,8	22,6	76,2	36,o	71,6	52,6
	1oo	6,7	6o,6	34,1	26,7	21,2	74,o	33,5	68,9	44,2
	2oo	5,6	53,7	22,3	13,7	12,o	63,1	27,2	61,o	37,4
Kontrollen ohne Globinfällung (B)	2o	7,5	53,1	33,1	24,3	22,3	74,o	27,3	63,8	42,8
	4o	8,o	55,2	35,3	26,2	23,o	76,o	31,2	65,1	44,2
	6o	8,1	62,8	33,2	29,7	26,1	75,6	35,2	67,5	49,1
	8o	6,5	61,3	31,7	26,1	25,2	74,6	37,7	65,o	47,6
	1oo	5,6	6o,5	29,1	25,4	23,6	69,o	34,6	63,2	45,2
	2oo	7,7	55,1	2o,2	14,3	12,2	58,2	25,2	59,1	35,6

Zu Abbildung 1: Bestimmung des p_H-Optimums bei der Fällung von Insulin.

Zu je 150 µl 2 g%-igem HGL wurden 10 µl des ^{131}J-Rinderinsulin-Serumansatzes und in aufsteigenden Reihen 10...1000 µl Glycinpuffer (p_H 8,45) gegeben.

Wie die Kurve zeigt, nahm die Fällung von Insulin durch HGL mit zunehmender Menge Glycinpuffer und steigenden p_H-Werten zu. Das Maximum lag bei 70 µl Puffer, wobei der p_H-Wert etwa 7 betrug. Bei weiter steigenden Mengen Glycinpuffer fällt die Kurve mit zunehmendem p_H-Wert wieder ab.

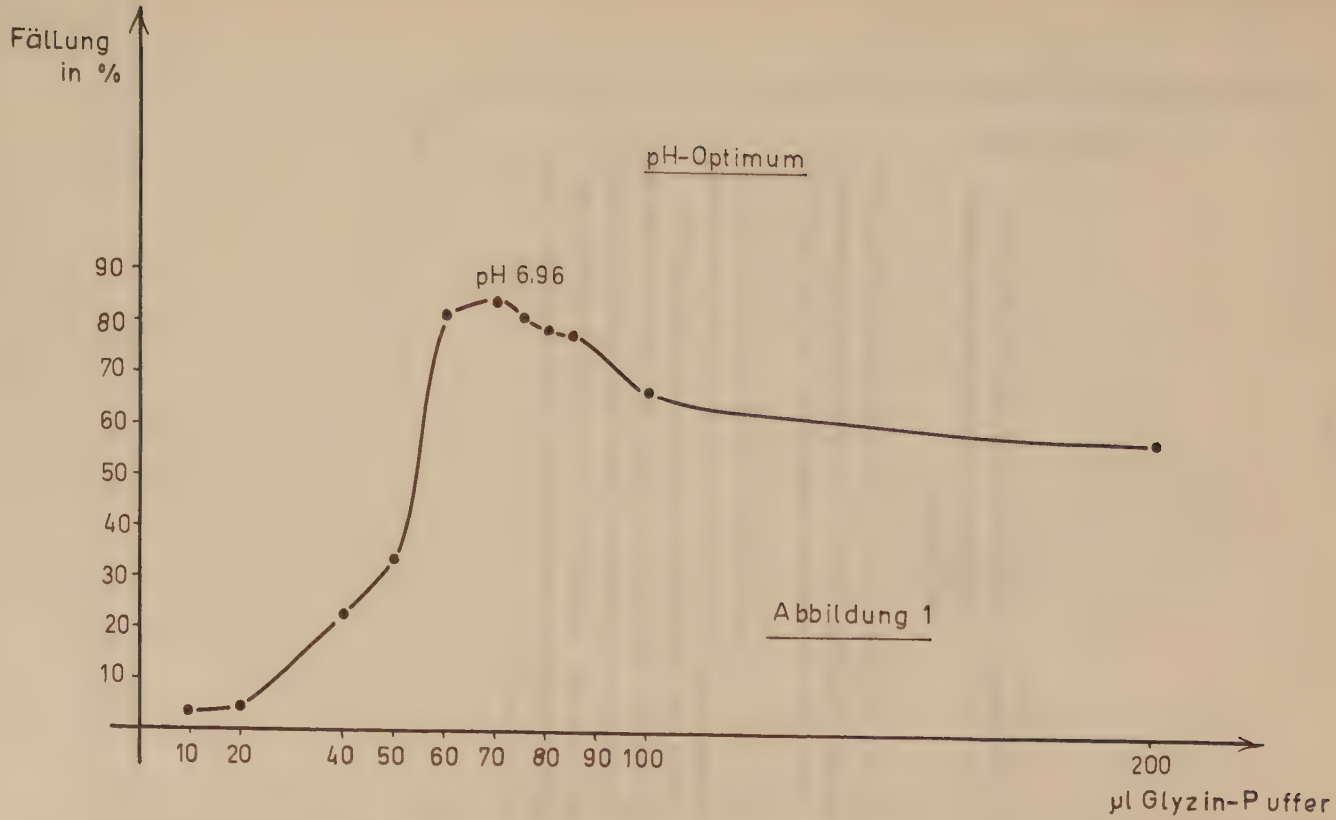

Fällung
in %
pH-Optimum
pH 6.96
90
80
70
60
50
40
30
20
10
10
20
40
50
60
70
80
90
100
200
µl Glyzin-Puffer

Abbildung 1

Zu Abbildung 2: Bestimmung der zur Fällung von Insulin erforderlichen minimalen HGL-Menge.

Jeweils lo µl des mit ^{131}J-Rinderinsulin versetzten Serums (≙ 15 ng Insulin) wurden vorgelegt und das Insulin mit steigenden Mengen HGL bei p_H 7 gefällt.

Von o,1...o,4 mg HGL-Zusatz zeigt die Kurve einen geringfügigen Anstieg. Die fällbare Radioaktivität steigt bei o,8 mg HGL steil an und erreicht bei 1,6 mg HGL den höchsten Wert, der auch bei höheren Zusätzen von Globin die 93%-Grenze nicht überschritt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich bei dem nicht fällbaren Insulinanteil um alteriertes Insulin handelt.

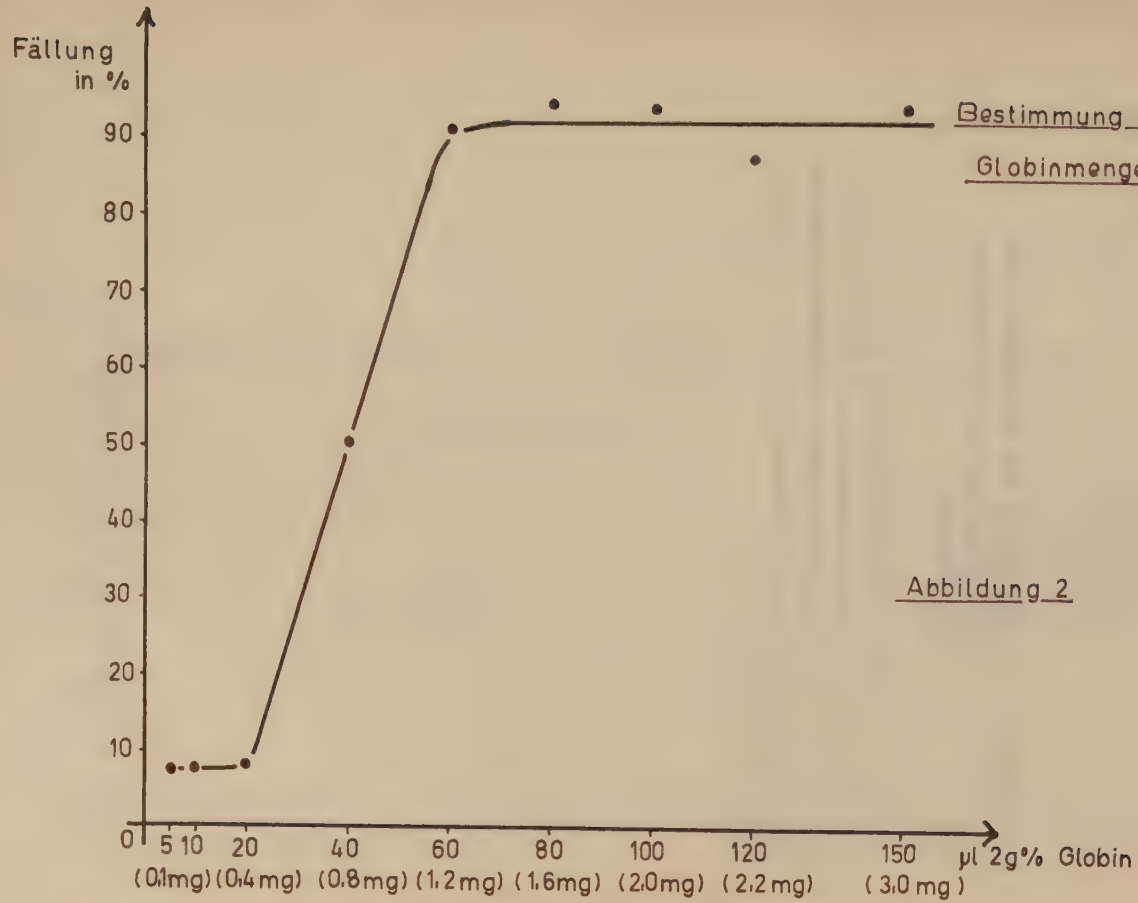

Fällung
in %
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5 10 20 40 60 80 100 120 150 µl 2g% Globin
(0,1mg) (0,4 mg) (0,8 mg) (1,2 mg) (1,6mg) (2,0mg) (2,2 mg) (3,0 mg)
Bestimmung der minimalen
Globinmenge

Abbildung 2

Zu Abbildung 3: Abhängigkeit der Fällbarkeit von Insulin mit HGL von der Insulin-Konzentration.

Es wurde eine Insulinverdünnungsreihe von 28...o,44 ng Insulin pro lo µl Serum angesetzt und das Insulin mit HGL gefällt. Die erzielten Ergebnisse liegen ziemlich gleichmäßig um 84,1% und werden durch die gestrichelte Gerade dargestellt.

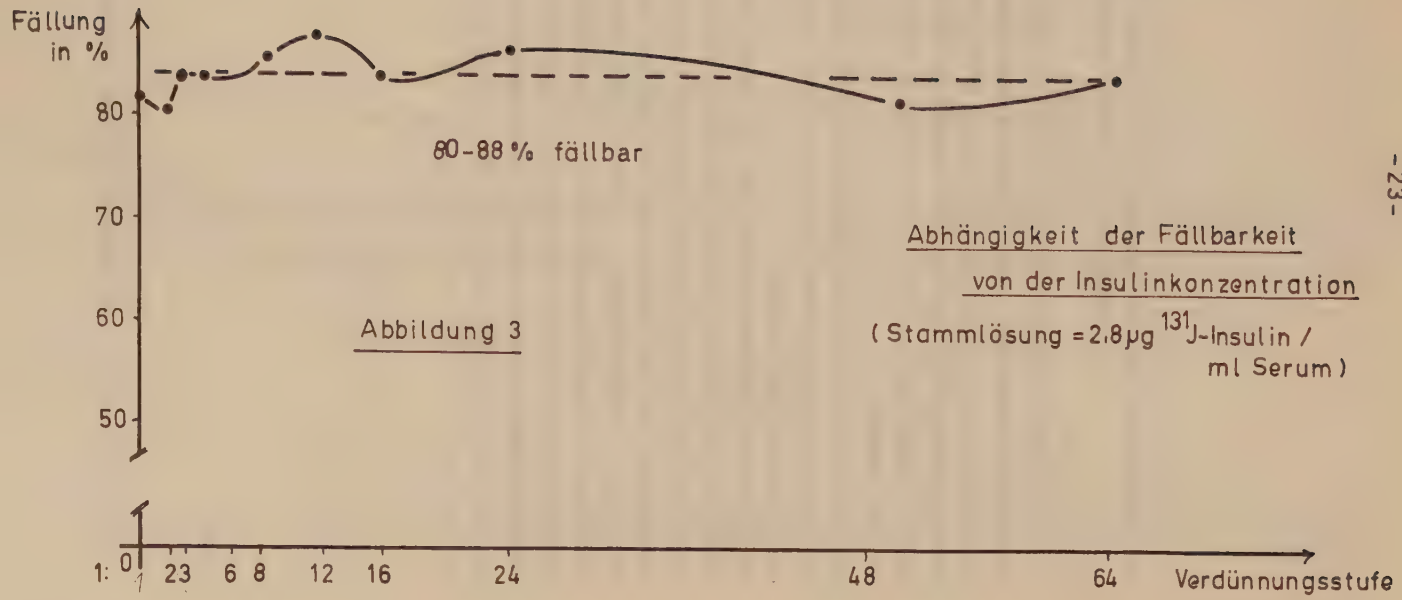


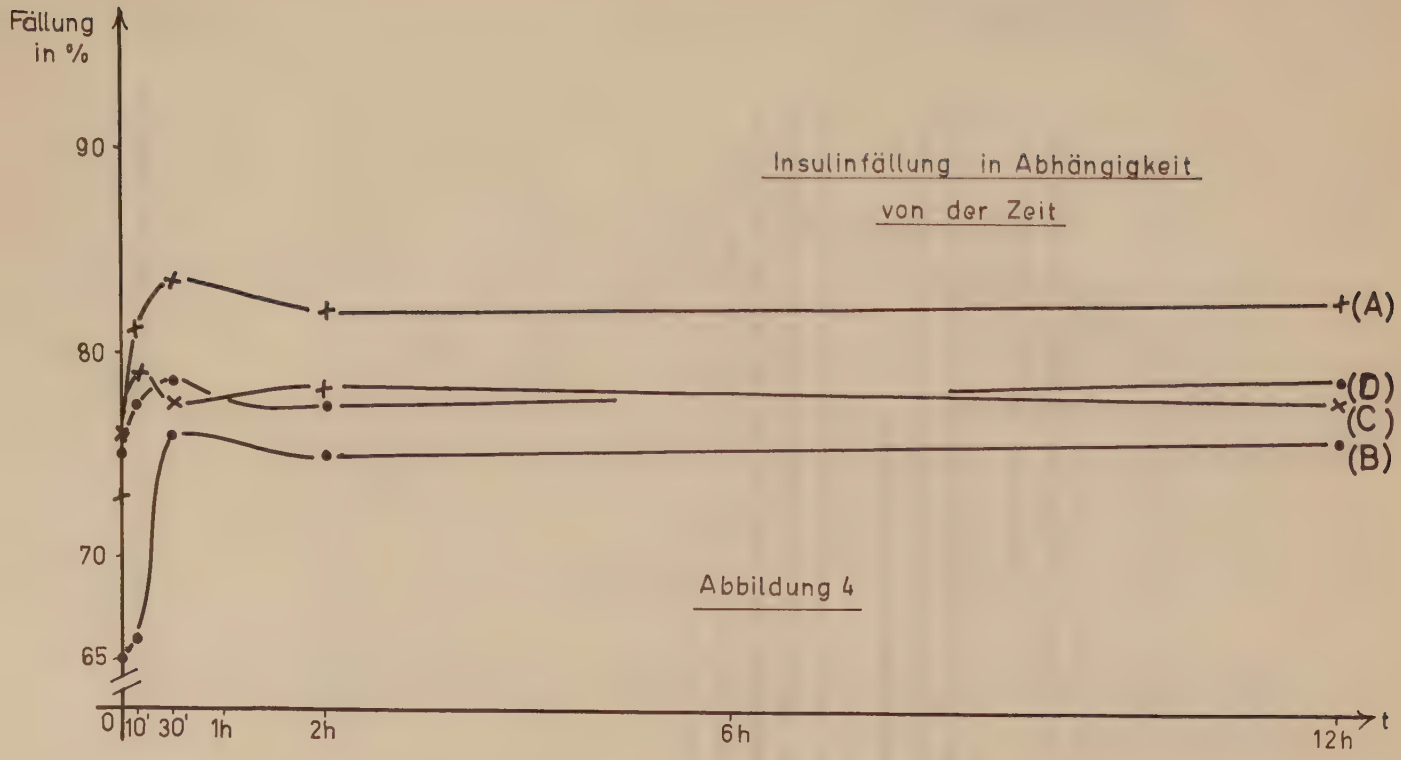
Abbildung 3

Abhängigkeit der Fällbarkeit von der Insulinkonzentration

(Stammlösung = 2,8 µg ^{131}J-Insulin / ml Serum)

Zu Abbildung 4: Insulinfällung durch Humanglobin in Abhängigkeit von der Zeit.

Je 10 µl eines normalen Humanserums (A), eines Diabetikerserums (B), einer 7%-igen Humangammaglobulinlösung (C) und einer 7%-igen Humanserumalbuminlösung (D), die mit ^{131}J-Insulin versetzt worden waren, wurden nach verschiedenen Zeiträumen mit HGL gefällt.
Die Kurven der fällbaren Radioaktivität zeigen von 0...30 min einen Anstieg, danach bleibt der Anteil des Präzipitates konstant.
In Gegenwart von Diabetikerserum (B) fiel etwas weniger Insulinradioaktivität aus, als bei den Kontrollen (A), (C) und (D). Diese Differenz ist zwar wahrscheinlich auf die Adsorption von Insulin an Insulinantikörper zurückzuführen, jedoch wurde offensichtlich auch das antikörpergebundene ^{131}J-Insulin durch Globin gefällt. Da der Insulinzusatz jeweils 1,5 µg/ml Proteinlösung betrug, lag die Insulinkonzentration im Bereich der Bindungskapazität des Diabetikerserum Ja. (= B).



Insulinfällung in Abhängigkeit von der Zeit

Abbildung 4

Zu Abbildung 5: Fällung des Insulins aus normalem Humanserum und aus Diabetikerseren.

Aus normalem Humanserum und aus Diabetikerseren verschiedener Bindungskapazität an Insulin wurde das radioaktive Insulin gefällt.

Die Kurven der fällbaren Radioaktivität steigen nach der Zugabe von 5o µl Glycinpuffer (p_H 8,45) erwartungsgemäß (vgl. Abb. 1) bis zum Optimum bei 7o bis 8o µl an und fallen ab 9o µl Glycinpuffer wieder etwas ab.

Insulinfällung aus Human-Normals. und Diabetikerserum

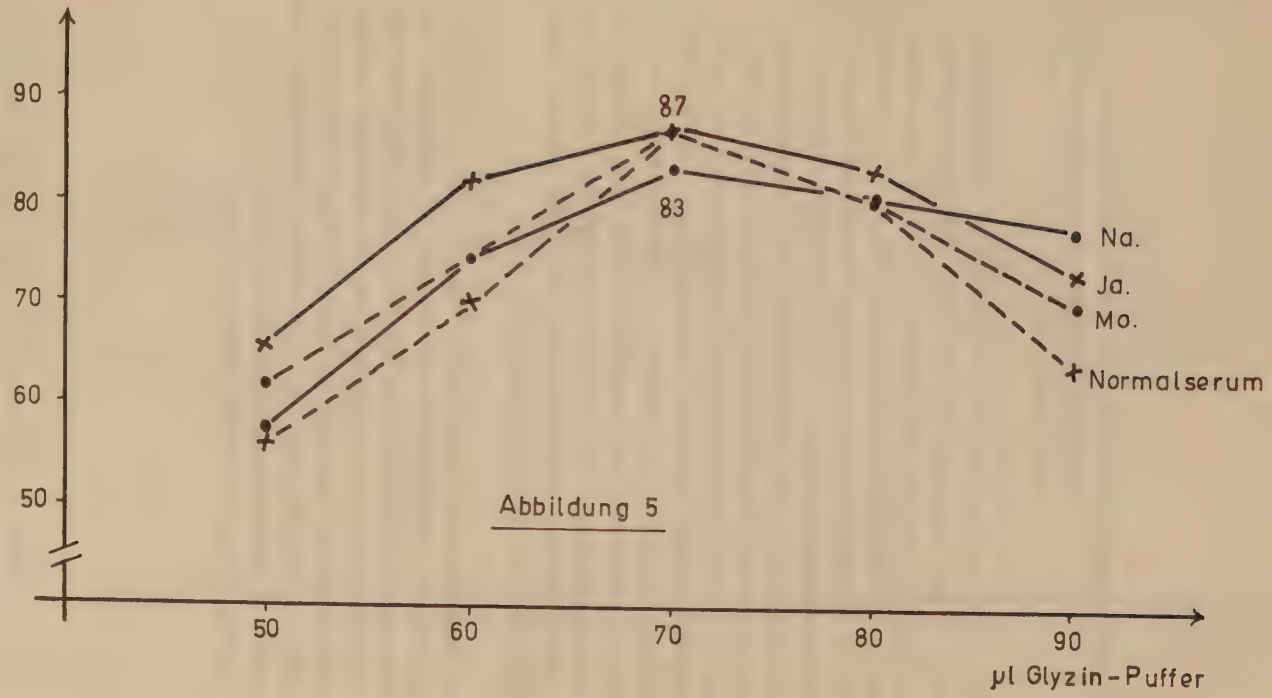


Abbildung 5

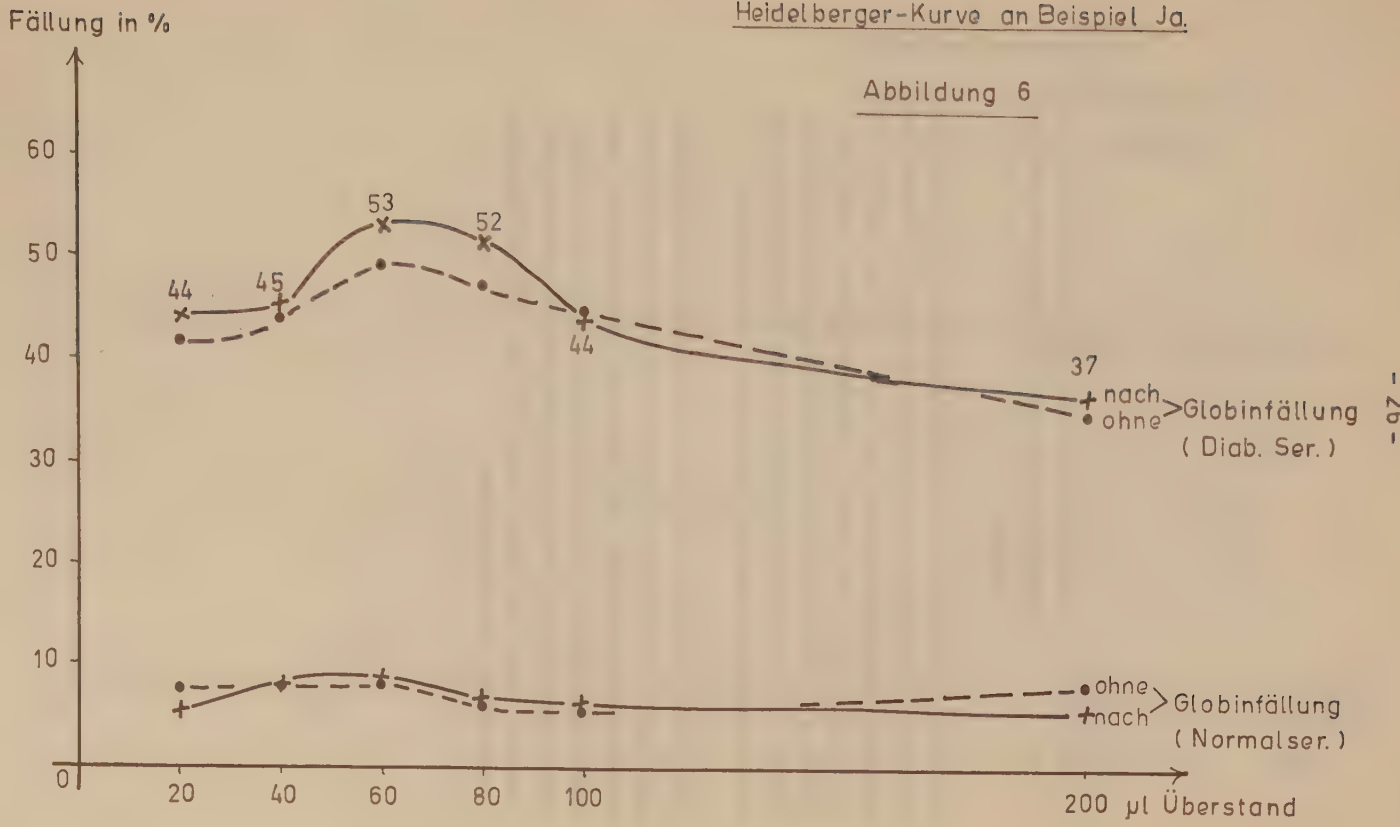
Zu Abbildung 6: Quantitative Präzipitinreaktion nach HEIDELBERGER am Beispiel von Diabetikerserum Ja.

Die Seren wurden jeweils zunächst mit ^{131}J-Insulin (≙ o,55 µg Insulin/ml Serum) versetzt und das radioaktive Insulin mit HGL gefällt. Zu den Überständen der Globinfällung wurde nochmals 46 ng ^{131}J-Insulin pro ml zugefügt und die Humangammaglobuline mittels Antihumangammaglobulin (-Kaninchengammaglobulin) präzipitiert. Eine Fällungskurve der Überstände eines normalen Humanserums und des Diabetikerserums Ja. nach und ohne HGL-Fällung wurde hergestellt zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Humanantigen zu Kaninchenantikörper. Es wurden je 2o... 2oo µl Überstand der Humanseren vorgelegt und mit 1o µl Antihumangammaglobulin (-Kaninchengammaglobulin) der Insulin-AK des Überstandes in Anlehnung an die Technik von SKOM und TALMAGE ausgefällt.

Am Beispiel des Diabetikerserums Ja. zeigt sich mit steigender Antigenmenge von 2o...6o µl Überstand ein Anstieg der Fällbarkeit, bis bei 6o µl Antigenlösung ein Maximalbereich (Äquivalenzzone) erreicht ist und die Kurve bei zunehmenden Mengen Antigenlösung wieder abfällt. Das zum Vergleich angeführte Kurvenpaar eines normalen Humanserums zeigt diese Erscheinung nicht. Weitere Beispiele siehe Tabelle 1.

Heidelberger-Kurve an Beispiel Ja.

Abbildung 6



Zu Abbildung 7: Einfluß unterschiedlicher Insulinkonzentration auf die Doppelantikörper-Fällung.

Die beiden Überstände des Diabetikerserums Ja. nach und ohne HGL-Fällung wurden durch Zusatz von ^{131}J-Insulin auf eine Endkonzentration von etwa o,o4 µg Insulin/ml Serum gebracht. Von beiden Ansätzen wurden je 1oo µl (≙ 18,5 ng Insulin) vorgelegt und 1o...5o µl 1:4 verdünnte ^{131}J-Insulinstammlösung dazupipettiert. Mit je 1o µl Kaninchengammaglobulinlösung wurde gefällt.

Die unterschiedliche Insulinkonzentration beeinflußte den Anteil der fällbaren Gesamtradioaktivität im untersuchten Bereich nicht, da sich die Insulinmengen weit innerhalb der Insulinbindungskapazität bewegten. Zugleich zeigt sich, daß eine vorangegangene Globinfällung den hier erfaßten Anteil die Insulinbindungskapazität nicht beeinträchtigte.

Doppel-AK-Fällung bei steigender Insulinkonzentration aus Serumüberstand Ja.

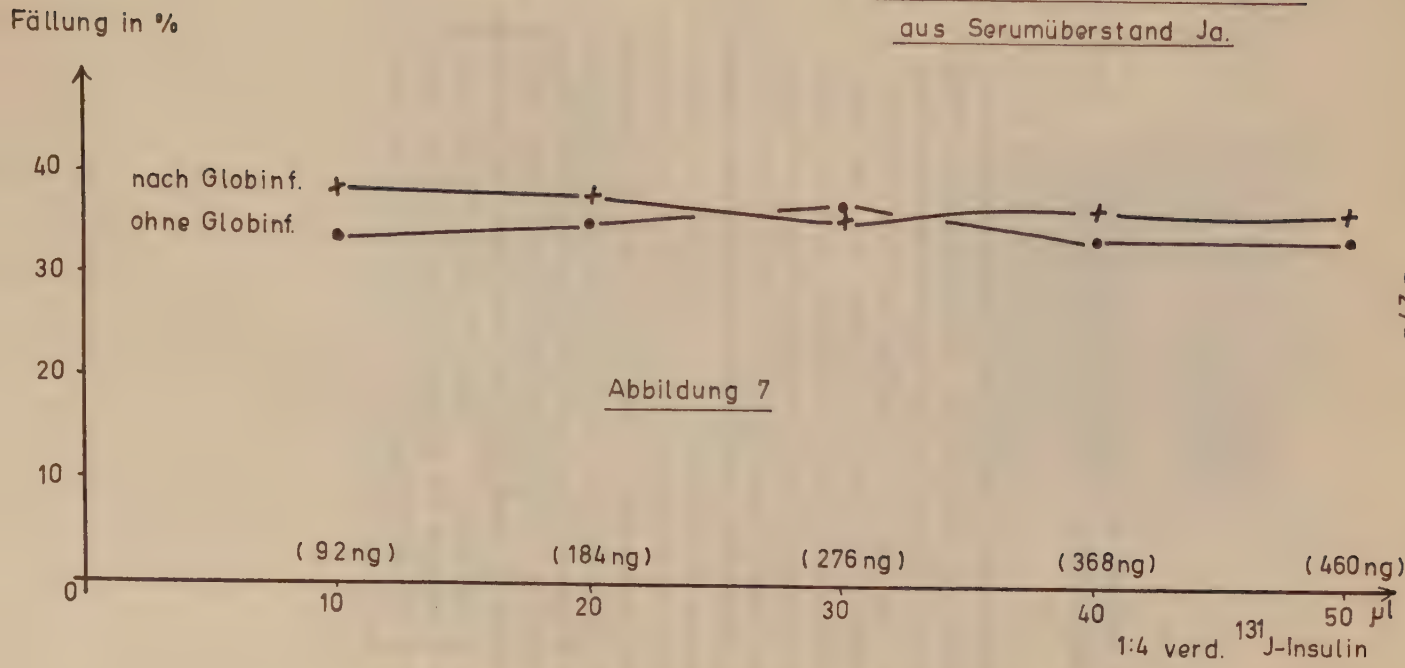


Abbildung 7

Zu Abb. 8:

Auftrennung der Überstände in der Agargel-Zonenelektrophorese

Je 1o µl eines normalen Humanserums, eines Diabetikerserums, einer 7%-igen Humangammaglobulinlösung und einer 7%-igen Humanserumalbuminlösung, die mit ^{131}J-Insulin versetzt worden waren, wurden nach Zugabe von jeweils 5o µl und in einer zweiten Reihe mit je 2o µl einer 2g%-igen HGL-Lösung durch 7o µl Glycinpuffer (p_H 8,45) gefällt. Das entsprach einer 5o%-igen und 8%-igen Fällung der Gesamtradioaktivität.
Die Überstände wurden in der Agargel-Zonenelektrophorese aufgetrennt.
Bei hoher HGL-Konzentration läßt sich ein löslicher Insulin-HGL-Komplex sichtbar machen. Bei niedriger HGL-Konzentration ist die Bindung von ^{131}J-Insulin an HGL beim Normalserum deutlicher als beim Diabetikerserum. Bei den 8%-igen Fällungen trat auf den Autoradiogrammen der Überstände wegen der geringeren Ausflockung des ^{131}J-Insulins durch HGL eine stärkere Schwärzung des Röntgenfilms auf, als bei der 5o%-igen Präzipitation.

Abb. 8

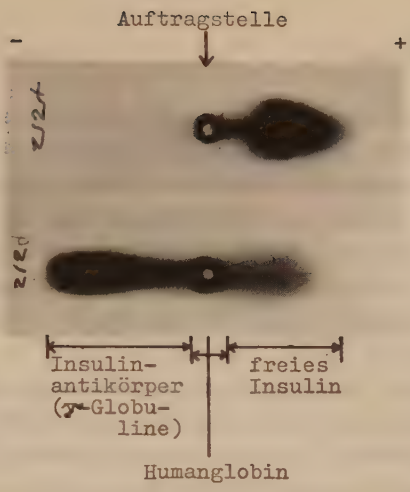


Tabelle: Autoradiographische Bestimmung der Bindung von ^{131}J-Insulin an Humanglobin. Anteile in % der Gesamtradioaktivität.

Serumart	Zusatz von µl 2g% HGL	Bindung an γ-Globulin	Bindung an HGL	freies Insulin
Norm.Ser.	20(=0,4mg)	0,0 %	13,86%	76,34%
Ha.	50(=1,0mg)	0,0 %	11,40%	75,25%
Diab.Ser.	20(=0,4mg)	61,0%	17,40%	18,32%
Ja.	50(=1,0mg)	59,7%	20,18%	17,06%

IV. Zusammenfassung

1. Diabetikerseren, die insulinbindende Antikörper enthielten, und Normalseren wurden mit ^{131}J-Rinderinsulin versetzt. Mit Humanglobin (= HGL) ließen sich sowohl aus den Diabetikerseren als auch aus den normalen Humanseren nach 3o Minuten Reaktionszeit bei Zimmertemperatur und p_H 6,96 über 8o % des ^{131}J-Insulins fällen. Dabei präzipitierten 1,6 mg HGL mindestens 15 ng Insulin aus. Die Insulinkonzentration und die Insulinbindungskapazität der Seren beeinflußten die Fällbarkeit des Insulins im untersuchten Meßbereich nicht.
2. Nach der Fällung von Insulin mit HGL waren in den Überständen intakte Insulinantikörper nachweisbar. Die Insulinbindungskapazität mancher Diabetikerseren stieg nach der HGL-Fällung sogar an, weil auch das im Serum der Patienten bereits vorhandene, wahrscheinlich von der Insulinsubstitution herstammende, nicht-radioaktive Insulin durch HGL aus den Bindungsplätzen der Antikörper entfernt wurde.
3. Durch Auftrennung der Überstände in der Agargel-Zonenelektrophorese ließ sich bei hoher HGL-Konzentration ein löslicher Insulin-HGL-Komplex nachweisen. Bei niedriger HGL-Konzentration war die Bindung von ^{131}J-Insulin an HGL beim Normalserum deutlicher als beim Diabetikerserum.

V. Literaturverzeichnis

BANTING, F.G., W.R. FRANKS and S. GAINS
Anti-Insulinactivity of serum of insulin treated patients. Amer.J.Psychiat. 95, 562, 1938

BECK, H.
Über insulinbindende Gammaglobuline.
Inaug.-Diss.Univ.Tübingen, 1966

BERSON, S.A., R.S. YALOW, A. BAUMANN, M.A.ROTHSCHILD und K. NEWERLY
Insulin-^{131}J metabolism in human subjects: Demonstration of insulin-binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J.Clin.Invest., 35, 170, 1956

BERSON, S.A., YALOW, R.S.
Recent studies on insulin-binding antibodies
Ann.N.Y.Acad.Sci., 82, 338, 1959

BERSON, S.A., YALOW, R.S.
Preparation and purification of human insulin-J^{131}; binding to human insulin-binding antibodies.
J.Clin.Invest., 40, 1803, 1961

BERSON, S.A., YALOW, R.S.
Radiochemical and radiobiological alterations of J^{131}-labelled proteins in solution.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 70, 56, 1957

DITSCHUNEIT, H. u. K. FEDERLIN
Die Pathophysiologie der Insulinresistenz.
Dtsch.med.Wschr., 91, 853, 1966

DOCUMENTA GEIGY
(Hrsg. K. DIEM u. C. LENTNER)
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Aufl., Geigy, Basel, 1968

GRIMMINGER, H. u. E. KALLEE
"Der Abbau von Insulin" in "Diabetes mellitus, Pathophysiologie und Klinik"
Hrsg.E.F. Pfeiffer, Lehmann, München, 257, 1969

HILL, B.J.
The adsorption of ^{131}I-insulin to glass.
Endocrinology, 65, 515, 1959

KABAT, E.A. and M.M. MAYER
Experimental immunochemistry.
Thomas, Springfield, 1961

KALLEE, E., D. DEBIASI u. A. D'ADDABBO
Studies on ^{131}I-labeled insulin.
Acta Isotop. (Padova), 3, 239, 1963

KALLEE, E., E. LANG u. W. HEINZEL
Neuer quantitativer, immunologischer Nachweis der leichtreversiblen Adsorption an Proteine.
Acta Isotop. (Padova), 3, 303, 1963

KALLEE, E.
"Radiojodiertes Insulin" in "Diabetes mellitus, Pathophysiologie und Klinik", Bd. I, S. 247
Hrsg. E.F.Pfeiffer, Lehmann
München, 1969

KALLEE, E.
Technische Kniffe bei Autoradiographien.
Rö.-Lab.Praxis, 11, R 127,
1958

KALLEE, E.
Die Bedeutung der Radioisotope für papierelektrophoretische und immunelektrophoretische Untersuchungen.
Ergeb.Labor.-Med. 3: 1o9-114
(1967) (11. Jahreskongreß für Laboratoriumsmedizin, Bad Kissingen 5.-9. Mai 1965), Medicus,
Berlin, 1967

LAPRESLE, C.
Conséquences immunologiques de l'insulinothérapie.
Path.Biol., 7, 1o65, 1959

LOWELL, F.C.
Evidence for the existence of low antibodies for crystalline insulin.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 49
167, 1942

NARAHARA, H.T. and WILLIAMS, R.H.
Effect of protein added in vitro upon insulin degradation and glucose uptake by muscle.
J.Biol.Chem., 233, 1958

NEWERLY, K. and BERSON, S.A.
Lack of specificity of insulin-^{131}-binding by isolated rat diaphragm.
Proceed.Soc.Exp.Biol. Med., 94, 751, 1957

PFEIFFER, E.F. u. H. DITSCHUNEIT
Aktuelle Probleme der Diabetikertherapie.
Dtsch.Med.Wschr., 87, 229o, 1962

ROTH, E. u. E. KALLEE
Papierelektrophoretische Farbstoffbindungsstudien, II. Z.Naturforschg., 8b, 614, 1953.

SCOTT, G.W., T.E. PROUT, J.A. WEAVER and S.P.ASPER
A comparison of the behavior of insulin and insulin labelled with ^{131}I in serum.
Diabetes, 7, 38, 1958

SKOM, J.H. and TALMAGE, D.W.
The role of nonprecipitating insulin antibodies in diabetes.
J.Clin.Invest., 37, 787, 1958

SKOM, J.H. and TALMAGE, D.W.
Nonprecipitating insulin antibodies.
J.Clin.Invest., 37, 783, 1958

TUFT, L.
Insulin hypersensitiveness; Immunologic considerations on case reports.
Amer.J.Med.Sci., 176, 1928

TOMIZAWA, H.H. and R.H. WILLIAMS
Studies of the specificy of an insulin-inactivating system of the liver.
J.Biol.Chem., 217, 685, 1955

VALLANCE-OWEN, J.
Insulin antagonists.
Brit.Med.Bull., 16, 214, 196o

Herrn Professor Dr.E. Kallee möchte ich für das Thema und die freundliche Anleitung zu dieser Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 13. Mai 1940 wurde ich, Wolfgang Harms, als Sohn des Zahnarztes Dr. Albert Harms und seiner Frau Elfriede, geb. Schulz, in Hamburg geboren. Ich besuchte die Volksschule und das Gymnasium in Hamburg.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Zahnheilkunde, bestand im Oktober 1966 die Zahnärztliche Vorprüfung und am 30. Juni 1969 das Staatsexamen.